

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 4 6 3 号	学位授与年月日	平成 2 1 年 3 月 1 0 日
氏 名	荒 井 真 木		
論文題目	Localization of megalin in rat vestibular dark cells and endolymphatic sac epithelial cells (ラットにおける前庭暗細胞、内リンパ嚢でのメガリンの局在)		

博士(医学) 荒 井 真 木

## 論文題目

Localization of megalin in rat vestibular dark cells and endolymphatic sac epithelial cells

(ラットにおける前庭暗細胞、内リンパ嚢でのメガリンの局在)

## 論文内容の要旨

### [はじめに]

メガリンは腎の近位尿細管に存在し、多数のリガンドを持つエンドサイトーシス受容体であり、様々な臓器の吸収作用のある上皮細胞に発現している。内耳前庭暗細胞は内リンパの恒常性と耳石の代謝に重要な役割があると言われているが、詳細は分かっていない。内リンパ嚢は内リンパ管で蝸牛、前庭とつながっており、内リンパ液のイオンや圧の調節に重要であると考えられている。我々は以前、ラット蝸牛管で血管条辺縁細胞にメガリンが存在することを報告した。前庭や内リンパ嚢でも機能している可能性を考え、その局在を免疫染色法によって調べた。

### [方法]

一次抗体はラットメガリンに特異的なウサギ抗体を、二次抗体は光学顕微鏡観察にはヒストファイニンシンプルステイン MAX-PO (MULTI)、電子顕微鏡観察には 15nm 金コロイド標識抗ウサギ IgG 抗体を使用した。ポジティブコントロールは腎を用いた。ネガティブコントロールは一次抗体として免疫していない正常ウサギ抗体を用いた。10 匹の Wistar rat を麻酔下で 4%パラホルムアルデヒドと 0.1%グルタルアルデヒドの混合液を用いて経心灌流固定した後、内耳と腎を摘出し 4℃で 2 時間固定した。光顕ではパラフィン包埋した組織切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼで 10 分間反応させた。一次抗体 (1 µg/ml BSA/PBS) に 4℃で一晩、二次抗体と室温で 30 分間反応させ、DAB 染色、ヘマトキシリン染色にて観察した。電顕では Lowicryl K4M に包埋後、超薄切片を作成し、一次抗体に 4℃で一晩、二次抗体と室温で 1 時間反応させてウラン鉛二重染色にて観察した。

### [結果]

腎では近位尿細管の細胞に反応があり、集合管には認めなかった。電顕レベルでは brush border 直下の上皮細胞にある大小のエンドサイトーシス小胞に認めた。

前庭では半規管暗細胞の内リンパ腔に面した膜とその直下に反応を認めたが、感覚細胞、支持細胞には認めなかった。

内リンパ嚢では上皮細胞と内リンパ腔に反応を認めた。強い反応は内リンパ腔の stainable substance に見られた。また上皮細胞での反応は細胞によって様々な程度の違いが見られ、細胞によっては側底膜側の細胞質にも認めた。小胞内での電顕所見は近位尿細管のそれとは異なっていた。尿細管では内リンパ腔側の小胞の膜に存在していたのに対し、内リンパ嚢上皮では腔側の小胞だけでなく、側底膜側の小胞にも見られ、反応は膜ではなく内容物に認めた。小胞を持たない細胞では、細胞質と内リンパ腔が連続して染色されるものもあった。

### [考察]

前庭暗細胞と血管条辺縁細胞は内リンパの恒常性維持にとって重要である。チャネルやトランスポーター、ATP アーゼは両者の細胞に共通して存在し、これらは特に  $K^+$  イオンの調節に重要である。メガリンの暗細胞での局在が、近位尿細管や辺縁細胞と類似することから、両者がリガンド依存性のエ

ンドサイトーシスにおいても相同性を持つことが示唆された。前庭暗細胞は耳石の代謝に関与していると言われている。耳石の成分にCaがあり、腎ではCa<sup>2+</sup>がメガリンのリガンドの一つであることから、前庭でもCa<sup>2+</sup>がリガンドになっている可能性があると考えられた。

組織学的に内リンパ腔には糖蛋白、グルコサミノグリカン、プロテオグリカンなどが染色され、stainable substance として知られている。Ishida らの報告同様、メガリンも stainable substance の一員ということが示された。内リンパ嚢上皮細胞の小胞にも局在しており、この所見も Ishida らの報告と一致するものであった。さらに内リンパ嚢では小胞の内容物に見られ、これらの小胞は頂側のみならず、側底膜側にも認められ、Fukazawa らによるインディアインクを使用し、内リンパ嚢でのピノサイトーシスによる輸送であることを示した実験結果と類似していた。ところが今回、腎での反応は endocytic 小胞の膜のみに見られた。この腎と内リンパ嚢での局在の違いは、メガリンの機能が両者で異なることを示唆するものであった。今回我々は、メガリンを小胞内に取り込む細胞以外に、細胞質から腔内に連続して染色されている細胞も認めた。これは Rask-Anderson らが示した糖蛋白の分泌所見と類似しており、このような細胞はメガリンを分泌していると考えた。内リンパ嚢上皮細胞は形態的に複数の細胞が存在し、細胞によって機能が異なると言われている。よって内リンパ嚢にはメガリンを分泌する細胞と吸収する細胞があることが考えられた。内リンパ嚢は糖蛋白、グルコサミノグリカン、プロテオグリカンなど高分子物質の吸収や分泌により、内リンパ圧の調節に重要な役割を果たしていると考えられているが、メガリンもそのような物質の一つであると推察された。

#### [結論]

前庭暗細胞、内リンパ嚢にメガリンは存在し、内リンパの恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

メガリンは腎の近位尿細管に存在し、多数のリガンドを持つエンドサイトーシス受容体であり、様々な臓器の吸収作用のある上皮細胞に発現している。申請者らはすでにラット蝸牛管の血管条辺縁細胞にメガリンが存在することを報告している。半規管前庭暗細胞も血管条辺縁細胞同様に内リンパの恒常性維持、特に K<sup>+</sup>イオンの調節に重要であることが知られており、チャネルやトランスポーター、ATPアーゼは両者の細胞に共通して存在している。また内リンパ嚢は内リンパ管で蝸牛、前庭とつながっており、内リンパ液のイオンや圧の調節に重要な役割を果たしていると考えられている。以上のことから、申請者らは前庭や内リンパ嚢においてもメガリンが何らかの機能を有していると考え、その局在を免疫染色法によって調べた。

10匹の Wistar rat を麻酔下に経心灌流固定し、内耳と腎を取り出し 4℃で2時間固定した。一次抗体はウサギ抗ラットメガリン抗体を用い、二次抗体は光学顕微鏡ではヒストファインシンプルステイン MAX-PO、電子顕微鏡では 15nm 金コロイド標識抗ウサギ IgG 抗体を使用した。ポジティブコントロールには腎を用い、ネガティブコントロールではウサギ non-immune IgG による replacement experiment を行った。光学顕微鏡では脱パラフィン後、一次抗体 (1 µg/ml BSA/PBS) と一晩、二次抗体と 30 分反応させ、DAB 染色、H-E 染色にて観察した。電子顕微鏡では LowicryK4M に包埋後、超薄切片を作成し、一次抗体と一晩、二次抗体と 1 時間反応させ、ウラン鉛二重染色にて観察した。

ポジティブコントロールの腎では近位尿細管の細胞で染色が認められ、この染色は replacement

experiment では認めなかった。集合管では染色は認めなかった。電子顕微鏡レベルでは上皮細胞 brush border 直下にある大小の endocytic 小胞膜状に金粒子を認めた。

前庭では半規管前庭暗細胞の内リンパ腔に面した膜の直下に金粒子を認めたが、感覚細胞、支持細胞には認めなかった。この所見は以前の蝸牛管血管条辺縁細胞での分布と類似していた。前庭暗細胞と血管条辺縁細胞はいずれもメガリンを介したエンドサイトーシスを行い、内リンパの恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられた。前庭暗細胞は耳石の代謝に関与していると言われている。耳石の成分に Ca があり、腎では  $\text{Ca}^{2+}$  がメガリンのリガンドの一つであることから、前庭でも  $\text{Ca}^{2+}$  はリガンドになっている可能性があると考えられた。

内リンパ嚢では上皮細胞と内リンパ腔に染色を認めた。強い反応は内リンパ腔の stainable substance に見られた。上皮細胞での染色は細胞によって様々であった。電子顕微鏡所見でも腎近位尿細管とは異なり、尿細管では内リンパ腔側の小胞の膜に存在していたのに対し、内リンパ嚢上皮では腔側の小胞だけでなく、側底膜側の小胞にも見られ、反応は膜ではなく内容物に認めた。小胞を持たない細胞では、細胞質と内リンパ腔が連続して染色されるものもあった。

内リンパ腔には糖蛋白、グリコサミノグリカン、プロテオグリカンなどが存在することが知られており stainable substance と呼ばれるが、メガリンも stainable substance の一つであることが示された。電子顕微鏡において金粒子は内リンパ腔、内リンパ嚢上皮細胞の細胞質や小胞内にも見られ、これらの小胞は頂側のみならず、側底膜側にも認められた。この所見は endocytic 小胞の膜のみに見られる腎近位尿細管の所見とは異なっていた。この腎と内リンパ嚢での局在の違いは、メガリンの機能が両者で異なることを示唆している。さらに電子顕微鏡にて上皮細胞の細胞質から内リンパ腔内に連続して金粒子が見られる細胞も認め、このような細胞はメガリンを分泌していると考えられた。内リンパ嚢上皮細胞は形態的に数種類の細胞が存在し、それぞれ機能が異なると言われていることから、内リンパ嚢にはメガリンを分泌する細胞と吸収する細胞があることが示唆された。内リンパ嚢上皮細胞が糖蛋白、グリコサミノグリカン、プロテオグリカンなど高分子物質を分泌することが報告されており、メガリンを含めたこのような高分子物質は内リンパ圧の調節に重要な役割を果たしていると考えられている。

審査委員会では、前庭暗細胞、内リンパ嚢におけるメガリンの局在を初めて明らかにし、内リンパの恒常性維持へのメガリンの役割に光を当てたことを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 内リンパと外リンパについて
- 2) 内リンパの産生細胞について
- 3) 内リンパ液の高  $\text{K}^{+}$  イオン維持のメカニズムについて
- 4) 三半規管と球形嚢、卵形嚢の有毛細胞の違いについて
- 5) 血管条の血流について
- 6) 耳石はどのように作られるか
- 7) メガリンの mRNA 発現について
- 8) 分泌メガリンの機能について
- 9) アミノグリコシド系薬剤の耳毒性について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位

論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査	難波 宏樹	
副査	浦野 哲盟	佐藤 康二